

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.14.012

健脾益肾化痰方含药血清对人肺鳞癌细胞凋亡、迁移及 LncRNA ALAL-1/USP4/HDAC2 通路的影响

方以峻¹, 王雪梅¹, 熊常州¹, 李刘邦¹, 覃慧敏¹, 王志光²✉

1. 广西中医药大学研究生院, 广西壮族自治区南宁市青秀区五合大道 13 号, 530200; 2. 广西中医药大学第一附属医院

[摘要] **目的** 从 LncRNA ALAL-1/USP4/HDAC2 信号通路探讨健脾益肾化痰方治疗肺鳞癌的可能作用机制。**方法** 40 只 SD 大鼠随机分为对照组和高、中、低浓度中药组, 每组 10 只。高、中、低浓度中药组大鼠分别灌胃 45、30、15 g/(kg·d) 健脾益肾化痰方浓缩液, 对照组灌胃 10 ml/(kg·d) 生理盐水, 每日 1 次, 连续 10 天后取血制备含药血清。人肺鳞癌细胞株 SK-MES-1 细胞分为对照血清组及健脾益肾化痰方低、中、高含药血清组, 对照血清组加入 10% 含生理盐水血清培养, 健脾益肾化痰方低、中、高含药血清组分别加入 10% 低、中、高浓度中药含药血清培养。孵育 48 h 后采用流式细胞术检测各组细胞凋亡情况, 计算总凋亡率; 细胞划痕实验观察 0 h 和培养 24 h 各组细胞迁移面积, 计算迁移率。另将 SK-MES-1 细胞分为对照血清组, 健脾益肾化痰方低、中、高含药血清组, LncRNA 沉默组, USP4 抑制组, HDAC2 抑制组, 对照血清组加入 10% 含生理盐水血清培养, 健脾益肾化痰方低、中、高含药血清组分别加入 10% 低、中、高浓度中药含药血清培养, LncRNA 沉默组转染 ALAL-1 siRNA, USP4 抑制组加入 35 μmol/L 去泛素化酶抑制剂 (PR-619), HDAC2 抑制组加入 60 μmol/L 伏立诺他, 培养 24、48 h 后, CCK-8 法检测各组细胞存活率; 培育 24 h 后 qPCR 法检测各组细胞 LncRNA ALAL-1、USP4、HDAC2 mRNA 表达; 培育 48 h 后免疫印迹法检测各组细胞 USP4、HDAC2 蛋白水平。**结果** 与对照血清组比较, 健脾益肾化痰方中、高含药血清组细胞总凋亡率显著升高, 健脾益肾化痰方低、中、高含药血清组细胞迁移率显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。健脾益肾化痰方低、中、高含药血清组细胞迁移率随浓度的升高而降低, 呈现浓度依赖性 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与对照血清组同时间比较, 各组细胞 24、48 h 时存活率均显著下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与健脾益肾化痰方低含药血清组同时间比较, 健脾益肾化痰方高含药血清组和 LncRNA 沉默组细胞在 24、48 h 时存活率亦降低 ($P<0.05$)。与对照血清组比较, 健脾益肾化痰方低、中含药血清组和 USP4 抑制剂组 USP4、HDAC2 mRNA 表达降低, 健脾益肾化痰方高含药血清组、LncRNA 沉默组 LncRNA ALAL-1、USP4、HDAC2 mRNA 表达降低, HDAC2 抑制剂组 HDAC2 mRNA 表达亦降低; 除 HDAC2 抑制剂组 USP4 蛋白水平外, 其余各组细胞中 USP4、HDAC2 蛋白水平均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 健脾益肾化痰方含药血清能够抑制人肺鳞癌细胞增殖, 促进凋亡, 其作用机制可能与其抑制 LncRNA ALAL-1/USP4/HDAC2 通路相关, 且以高浓度效果最好。**[关键词]** 肺鳞癌; 健脾益肾化痰方; 细胞凋亡; 细胞迁移; 长链非编码 RNA; 泛素特异性蛋白酶 4; 组蛋白去乙酰化酶 2

肺癌是全球范围内发病率和死亡率较高的恶性肿瘤之一, 其中肺鳞癌占比超过 20%, 其治疗进展明显落后于肺腺癌, 严重威胁着人类的健康^[1]。尽

管现代医学在癌症治疗方面取得了诸多进展, 但仍存在疗效有限、副作用大等问题。健脾益肾化痰方是广西中医药大学第一附属医院院内制剂, 在临床实践中发现其对肺鳞癌患者具有改善症状、延长生存期的作用^[2], 但具体的作用机制尚不明确。

近几年来, 程序性死亡受体 1/程序性死亡配体 1

基金项目:国家自然科学基金(82160926);广西自然科学基金重点项目(2024GXNSFDA010033)

✉ 通讯作者: a1860@126.com

(PD-1/PD-L1) 类抗体的免疫疗法虽然为肺鳞癌治疗带来了巨大突破,但对于晚期患者的有效率仅为 20% 左右^[3]。长链非编码 RNA (LncRNA) 参与了包括肺癌在内的多种肿瘤的侵袭、迁移和增殖,被认为是肿瘤免疫中非常重要的调控因子^[4]。既往研究发现,长链非编码 RNA ALAL-1(LncRNA ALAL-1) 可通过复杂的分子机制调控泛素特异性蛋白酶 4 (USP4) 的表达水平^[5]。USP4 作为一种重要的去泛素化酶,其表达改变会影响下游组蛋白去乙酰化酶 2 (HDAC2) 的活性^[6]。而 HDAC2 是表观遗传调控的核心因子,异常激活的 HDAC2 会重塑染色质结构,改变一系列与细胞增殖、侵袭、迁移以及免疫逃逸相关基因的表达模式^[7-8]。因此,本研究拟通过细胞实验从细胞水平观测其对肺鳞癌细胞迁移、增殖、凋亡的影响,并从 LncRNA ALAL-1/USP4/HDAC2 关键通路及相关分子靶点的变化情况探讨健脾益肾化痰方治疗肺鳞癌的可能作用机制,为其临床应用提供依据。本实验规程及方案符合广西中医药大学伦理委员会审查标准(批准号:DW20240507-102)。

1 材料

1.1 动物及细胞

人肺鳞癌 SK-MES-1 细胞株(货号:CL-0213),购自武汉普诺赛生物科技有限公司。SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,体质量 250~280 g,12 周龄,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产合格证号:SCXK(湘)2019-0004。大鼠饲养于广西中医药大学,温度 20~25℃,湿度 40%~60%,室内明暗交替 12 h,给予充足的饲料和饮用水,垫料 3 日更换 1 次。

1.2 药物

健脾益肾化痰方组成:人参 10 g,黄芪 40 g,白术 12 g,醋鳖甲 10 g,鸡内金 10 g,法半夏 20 g,浙贝母 15 g,熟地黄 20 g,山萸肉 12 g,当归 12 g。以上药品均购自广西中医药大学第一附属医院中药房,饮片以纯净水浸泡中药高出药面约 3 cm,浸泡约 30 min,按常规方法煎煮 3 次,将所有的药液混合后用文火煎煮,浓缩制成每毫升含有 2 g 生药的汤剂,分装后 4℃ 保存。

1.3 主要试剂及仪器

胎牛血清、Lipofectamine 3000 转染试剂盒、蛋白酶和磷酸酶抑制剂、胰蛋白酶-EDTA 溶液(美国赛默飞世尔科技中国有限公司,批号分别为

2324371、2730878、C25200-056、XH350835); MEM (含 NEAA) 基础培养基(武汉普诺赛有限公司,批号 WHB823E131); 青链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司,批号 240004003); SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、强 RIPA 裂解液(上海碧云天生物科技股份有限公司,批号分别为 011023230327、012923230317); 总 RNA 提取试剂盒(莫纳苏州生物科技有限公司,批号 110652); 逆转录试剂盒、qPCR 荧光定量预混液(上海吐露港生物科技有限公司,批号 23N27601、Lot 24N14801); 超敏 ECL 发光试剂盒(武汉三鹰生物技术有限公司,批号 20032395); 10%PAGE 凝胶试剂盒、三色预染蛋白 Marker(上海雅酶生物医药科技有限公司,批号 03791900、028811999); 辣根过氧化物酶(HRP)山羊抗兔抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号 AC230521001); 兔源 GAPDH 抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号 62u0922); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海宏叶生物科技有限公司,批号 GK10009); USP4 抗体(SAB 南京莱富赛生物科技有限公司,批号 4613); HDAC2 抗体(杭州华安生物技术有限公司,批号 H660016007); 伏立诺他(美国 Selleck 生物科技有限公司,批号 s104715); 去泛素化酶抑制剂(PR-619,上海皓元生物医药科技有限公司,批号 18331); ALAL-1 siRNA(广州复能基因有限公司,批号 RY207086); Annexin V-FITC/PI 流式细胞凋亡检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号 AK80195); CCK-8 细胞增殖试剂盒(深圳默鸿科技有限公司,批号 B6005M)。

Thermo371CO₂ 细胞培养箱、Sorvall ST 40 高速台式离心机、Attune NxT 声波聚焦流式细胞仪(美国赛默飞世尔科技有限公司); TECAN Infinite M200 pro 全波长多功能酶标仪(帝肯上海实验器材有限公司); A300 基因扩增仪(朗基科学仪器有限公司); SVE-2 垂直电泳仪、SVT-2 转印电泳仪(武汉赛维尔生物科技有限公司); ChemiScope6100 化学发光凝胶成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司); Light Cycler480 德国罗氏荧光定量 PCR 仪(罗氏诊断产品有限公司)。

1.4 含药血清的制备

将 40 只大鼠编号为 1-40 号,使用 SPSS 20.5 为每只大鼠生成一个随机数,按照随机数从小到大排序,1-10 号为对照组,11-20 号为低浓度中药组,21-30 号为中浓度中药组,31-40 号为高浓度中药组。

根据《中药药理研究方法学》^[9]人与大鼠体表面积比进行中药等效剂量换算,按3:2:1比例将中药组按高、中、低浓度分别灌胃45、30、15 g/(kg·d)健脾益肾化痰方浓缩液,对照组灌胃10 ml/(kg·d)生理盐水,各组均每日灌胃1次,连续10天。最后一次灌胃次日在无菌条件下,进行腹主动脉取血,室温中静置4 h,常温3000 r/min离心15 min(离心半径20.9 cm),收集血清,56℃水浴30 min灭活,然后在超净台内用注射滤器(0.22 μm微孔滤膜)过滤除菌分装后储存于-20℃。

2 方法

2.1 细胞培养

将-80℃储存的人肺鳞癌细胞株SK-MES-1冻存管从冰箱取出后,迅速于37℃水浴锅解冻后移细胞至离心管,加入完全培养基[89%MEM(含NEAA),10%FBS,1%PS]后常温离心5 min(1000 r/min,离心半径20.9 cm),弃上清液后加入完全培养基重悬细胞,接种于培养瓶中,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。待细胞生长状态良好,密度约90%时,加入0.25%胰蛋白酶溶液消化细胞进行种板或传代培养以供后续研究。

2.2 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况

于6孔板内接种SK-MES-1细胞2×10⁵个/孔,孵育24 h贴壁后,分为对照血清组及健脾益肾化痰方低、中、高含药血清组,每组3个复孔。对照血清组加入10%含生理盐水血清培养,健脾益肾化痰方低、中、高含药血清组分别加入10%低、中、高浓度中药含药血清培养,孵育48 h后去除原培养基,消化收集细胞。按Annaxin V-FITC/PI试剂盒说明书处理细胞后,用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。总凋亡率=细胞早期凋亡率+细胞晚期凋亡率。

2.3 细胞划痕实验观察各组细胞迁移能力

于6孔板内接种SK-MES-1细胞2×10⁵个/孔,孵育24 h贴壁后,使用200 μl的无菌枪头在每孔中线处垂直于细胞单层表面轻轻划一道宽度均匀直线,划完后用PBS缓慢轻柔地冲洗培养板以去除划下的细胞碎片。分组及给药情况同2.2,于0 h和培养24 h拍照记录。使用Image J 1.8.0软件计算迁移面积、迁移率。迁移率(%)=(初始划痕面积-实验结束时划痕面积)/初始划痕面积×100%。

2.4 CCK-8法检测各组细胞存活率

于96孔板内接种SK-MES-1细胞8×10³个/孔,

孵育24 h贴壁以后,分为对照血清组,健脾益肾化痰方低、中、高含药血清组,LncRNA沉默组,USP4抑制组,HDAC2抑制组,每组6个复孔。空白组不接种细胞,对照血清组加入10%含生理盐水血清培养,健脾益肾化痰方低、中、高含药血清组分别加入10%低、中、高浓度中药含药血清培养,LncRNA沉默组转染ALAL-1 siRNA,USP4抑制组加入35 μmol/L PR-619含药培养基,HDAC2抑制组加入60 μmol/L伏立诺他。于培养箱分别孵育24、48 h后,向每孔加入CCK-8溶液后于酶标仪检测450 nm处吸光度值,根据检测的吸光度值计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(实验血清组OD值-空白组OD值)/(对照血清组OD值-空白组OD值)×100%。

2.5 实时荧光定量PCR检测各组细胞LncRNA ALAL-1、USP4、HDAC2 mRNA表达

于6孔板内接种SK-MES-1细胞2×10⁵个/孔,分组及干预方法同2.4,每组3个复孔。孵育24 h贴壁后去除培养基,消化收集细胞,根据试剂盒实验步骤提取RNA,逆转录合成cDNA后使用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法分别测定LncRNA ALAL-1、USP4、HDAC2 mRNA表达水平。反应程序为:95℃ 30 s、95℃ 10 s、60℃ 30 s,共40个循环。使用2^{-ΔΔCt}法进行相对定量分析。引物序列由南宁市捷尼斯生物科技有限公司合成,见表1。

表1 ALAL-1、USP4、HDAC2引物序列
Table 1 Primer sequences of ALAL-1, USP4, HDAC2

基因	引物序列(5'→3')	产物长度 /bp
LncRNA ALAL-1	上游CCCCGTTACACCCTGTTCTC	161
	下游GGGCAGTTCTAGCCAACAGT	
USP4	上游TGTATTGGTCCCTACCGAGGC	107
	下游TGACAAACAGGCCATGCTCC	
HDAC2	上游CCGCATGACCCATAACTTGCT	90
	下游GTCATTCTCTCGGCAGTGGCT	
GAPDH	上游CAGGAGGCATTGCTGATGAT	138
	下游GAAGGCTGGGGCTCATT	

注:LncRNA ALAL-1,长链非编码NA ALAL-1;USP4,泛素特异性蛋白酶4;HDAC2,组蛋白去乙酰化酶2;GAPDH,甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

2.6 免疫印迹法检测各组细胞USP4、HDAC2蛋白水平

于6孔板内接种SK-MES-1细胞2×10⁵个/孔,孵育24 h贴壁后,分组及干预方法同2.4,每组3个复孔。孵育48 h后去除培养基,消化收集细胞,提

取总蛋白。采用 BCA 法定量蛋白浓度，Loading 缓冲液按比例充分混合，100 ℃金属浴变性 10 min。取蛋白于凝胶中电泳分离，湿转至 PVDF 膜，快速封闭液封闭 15 min，洗膜，加入 USP4（稀释比为 1：2000）、HDAC2（稀释比为 1：10 000）、GAPDH（稀释比为 1：15 000）蛋白一抗，4 ℃分别孵育过夜，第 2 天洗膜后孵育山羊抗兔抗体（稀释比为 1：3000），室温孵育 120 min，浸入配制好的显影液中，自动曝光显影。采用 Image J 1. 8. 0 软件分析条带灰度值，根据目的蛋白与内参的灰度值计算相对表达量。

2. 7 统计学方法

采用 SPSS 25. 0 软件进行统计分析，本研究计量资料均符合正态分布且方差齐，以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 描述，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 检验，以 $P<0. 05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3. 1 各组细胞总凋亡率比较

表 2 示，与对照血清组比较，健脾益肾化痰方中、高含药血清组细胞总凋亡率显著升高 ($P<0. 05$ 或 $P<0. 01$)；与健脾益肾化痰方低含药血清组比较，健脾益肾化痰方中、高含药血清组细胞总凋亡率亦升高 ($P<0. 05$)；而健脾益肾化痰方中、高含药血清组细胞总凋亡率差异无统计学意义 ($P>0. 05$)。

表 2 各组人肺鳞癌细胞总凋亡率比较

Table 2 Comparison of total apoptosis rate of human lung squamous carcinoma cells among groups (% , $\bar{x}\pm s$)		
组别	复孔数	总凋亡率
对照血清组	3	5. 10±0. 47
健脾益肾化痰方低含药血清组	3	6. 48±0. 83
健脾益肾化痰方中含药血清组	3	9. 25±0. 67 ^{a) b)}
健脾益肾化痰方高含药血清组	3	10. 37±0. 64 ^{b) c)}

注：a) 与对照血清组比较， $P<0. 05$ ；b) 与健脾益肾化痰方低含药血清组比较， $P<0. 05$ ；c) 与对照血清组比较， $P<0. 01$ 。

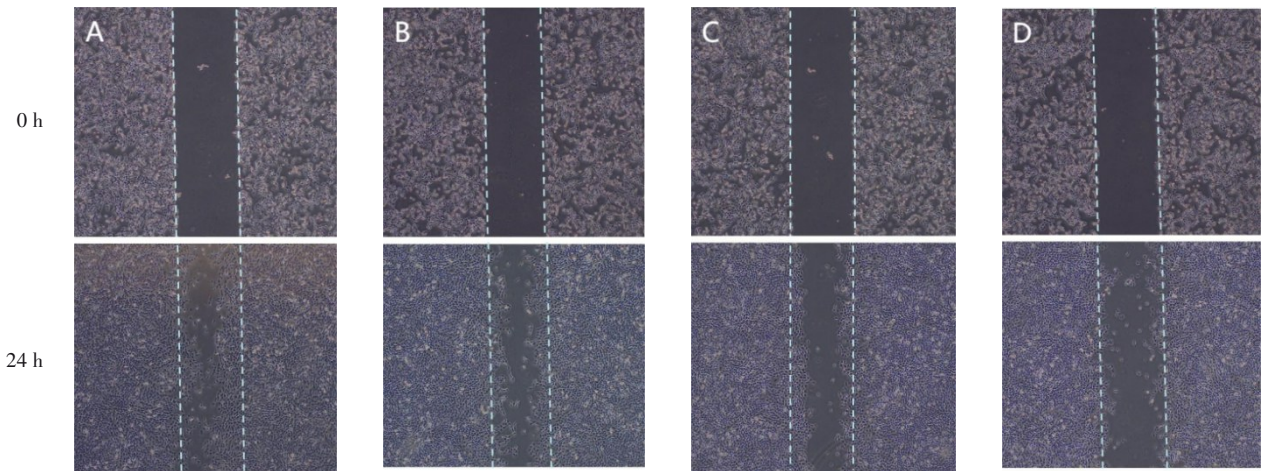
3. 2 各组细胞迁移能力比较

表 3 示，与对照血清组比较，健脾益肾化痰方低、中、高含药血清组细胞迁移率显著降低 ($P<0. 05$ 或 $P<0. 01$)；健脾益肾化痰方低、中、高含药血清组细胞迁移率随浓度的升高而降低，呈现浓度依赖性，各浓度间比较差异均有统计学意义 ($P<0. 05$ 或 $P<0. 01$)。各组人肺鳞癌细胞划痕图见图 1。

表 3 各组人肺鳞癌细胞迁移率比较

Table 3 Comparison of migration rate of human lung squamous carcinoma cells among groups (% , $\bar{x}\pm s$)		
组别	复孔数	迁移率
对照血清组	3	74. 57±2. 33
健脾益肾化痰方低含药血清组	3	55. 23±1. 5 ^{a)}
健脾益肾化痰方中含药血清组	3	42. 50±1. 15 ^{b) c)}
健脾益肾化痰方高含药血清组	3	24. 67±3. 22 ^{b) d) e)}

注：a) 与对照血清组比较， $P<0. 05$ ；b) 与对照血清组比较， $P<0. 01$ ；c) 与健脾益肾化痰方低含药血清组比较， $P<0. 05$ ；d) 与健脾益肾化痰方低含药血清组比较， $P<0. 01$ ；e) 与健脾益肾化痰方中含药血清组比较， $P<0. 01$ 。



注：A，对照血清组；B，健脾益肾化痰方低含药血清组；C，健脾益肾化痰方中含药血清组；D，健脾益肾化痰方高含药血清组。

图 1 各组人肺鳞癌细胞划痕图 (×4)

Figure 1 Scratch diagram of human lung squamous carcinoma cells in various groups (×4)

3.3 各组细胞不同时间存活率比较

表4示,与对照血清组同时间比较,各组细胞24、48 h时存活率均显著下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与健脾益肾化痰方低含药血清组同时间比较,健脾益肾化痰方高含药血清组和LncRNA沉默组细胞在24、48 h时存活率亦降低,USP4抑制剂组和HDAC2抑制剂组细胞仅在48 h降低 ($P<0.05$);与健脾益肾化痰方中含药血清组同时间比较,健脾益肾化痰方高含药血清组24 h时细胞存活率降低,USP4抑制剂组24 h时存活率升高,HDAC2抑制剂组细胞48 h时存活率降低 ($P<0.05$);与健脾益肾化痰方高含药血清组比较,USP4抑制剂组和HDAC2抑制剂组细胞在24 h时存活率升高 ($P<0.05$)。

3.4 各组细胞中 LncRNA ALAL-1、USP4、HDAC2 mRNA 表达比较

表5示,与对照血清组比较,健脾益肾化痰方低、中含药血清组和USP4抑制剂组 USP4、HDAC2 mRNA 表达降低,健脾益肾化痰方高含药血清组、LncRNA 沉默组 LncRNA ALAL-1、USP4、HDAC2

mRNA 表达降低,HDAC2抑制剂组 HDAC2 mRNA 表达亦降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与健脾益肾化痰方低含药血清组比较,健脾益肾化痰方中、高含药血清组和LncRNA沉默组 LncRNA ALAL-1 mRNA 表达降低,USP4抑制剂组 USP4 mRNA 表达降低,HDAC2抑制剂组 HDAC2 mRNA 表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与健脾益肾化痰方中含药血清组比较,健脾益肾化痰方高含药血清组和LncRNA沉默组 LncRNA ALAL-1 mRNA 表达降低,USP4抑制剂组 USP4 mRNA 表达降低,HDAC2抑制剂组 HDAC2 mRNA 表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与健脾益肾化痰方高含药血清组比较,USP4抑制剂组 USP4 mRNA 表达降低,HDAC2抑制剂组 HDAC2 mRNA 表达降低 ($P<0.05$);USP4抑制剂组 LncRNA ALAL-1 mRNA 表达高于对照血清组及健脾益肾化痰方低、中、高含药血清组 ($P<0.01$);HDAC2抑制剂组 USP4 mRNA 表达高于对照血清组及健脾益肾化痰方低、中、高含药血清组, LncRNA ALAL-1 mRNA 表达高于健脾益肾化痰方高含药血清组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表4 各组人肺鳞癌细胞不同时间存活率比较

Table 4 Comparison of survival rates of human squamous lung cancer cells at different times in each group (% , $\bar{x}\pm s$)			
组别	复孔数	24 h	48 h
对照血清组	6	100.00	100.00
健脾益肾化痰方低含药血清组	6	82.87 $\pm$ 2.17 ^{a)}	78.90 $\pm$ 0.38 ^{b)}
健脾益肾化痰方中含药血清组	6	78.32 $\pm$ 1.94 ^{a)}	75.70 $\pm$ 2.20 ^{b)}
健脾益肾化痰方高含药血清组	6	71.29 $\pm$ 1.30 ^{b) c) d)}	68.18 $\pm$ 2.01 ^{b) c)}
LncRNA 沉默组	6	74.97 $\pm$ 3.36 ^{b) c)}	69.07 $\pm$ 0.80 ^{b) c)}
USP4抑制剂组	6	86.00 $\pm$ 4.78 ^{a) d) e)}	71.90 $\pm$ 3.70 ^{b) c)}
HDAC2抑制剂组	6	79.93 $\pm$ 1.60 ^{b) c)}	63.23 $\pm$ 0.75 ^{b) c) d)}

注: a) 与同时间对照血清组比较, $P<0.05$; b) 与同时间对照血清组比较, $P<0.01$; c) 与同时间健脾益肾化痰方低含药血清组比较, $P<0.05$; d) 与同时间健脾益肾化痰方中含药血清组比较, $P<0.05$; e) 与同时间健脾益肾化痰方高含药血清组比较, $P<0.05$ 。

表5 各组人肺鳞癌细胞中 LncRNA ALAL-1、USP4、HDAC2 mRNA 表达比较

Table 5 Comparison of LncRNA ALAL-1, USP4, and HDAC2 mRNA expression in each group ($\bar{x}\pm s$)				
组别	复孔数	LncRNA ALAL-1	USP4	HDAC2
对照血清组	3	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.08
健脾益肾化痰方低含药血清组	3	1.09 $\pm$ 0.08	0.87 $\pm$ 0.03 ^{a)}	0.82 $\pm$ 0.07 ^{a)}
健脾益肾化痰方中含药血清组	3	0.86 $\pm$ 0.08 ^{b)}	0.84 $\pm$ 0.05 ^{a)}	0.81 $\pm$ 0.09 ^{a)}
健脾益肾化痰方高含药血清组	3	0.72 $\pm$ 0.09 ^{a) b) c)}	0.82 $\pm$ 0.04 ^{a)}	0.72 $\pm$ 0.02 ^{c)}
LncRNA 沉默组	3	0.63 $\pm$ 0.07 ^{c) d) e)}	0.81 $\pm$ 0.01 ^{a)}	0.73 $\pm$ 0.11 ^{c)}
USP4抑制剂组	3	1.39 $\pm$ 0.14 ^{c) d) f) h)}	0.57 $\pm$ 0.04 ^{c) d) e) g)}	0.70 $\pm$ 0.08 ^{c)}
HDAC2抑制剂组	3	0.99 $\pm$ 0.13 ^{e)}	1.66 $\pm$ 0.06 ^{c) d) f) h)}	0.51 $\pm$ 0.06 ^{c) d) f) g)}

注: LncRNA ALAL-1, 长链非编码RNA ALAL-1; USP4, 泛素特异性蛋白酶4; HDAC2, 组蛋白去乙酰化酶2。

a) 与对照血清组比较, $P<0.05$; b) 与健脾益肾化痰方低含药血清组比较, $P<0.05$; c) 与对照血清组比较, $P<0.01$; d) 与健脾益肾化痰方低含药血清组比较, $P<0.01$; e) 与健脾益肾化痰方中含药血清组比较, $P<0.05$; f) 与健脾益肾化痰方中含药血清组比较, $P<0.01$; g) 与健脾益肾化痰方高含药血清组比较, $P<0.05$; h) 与健脾益肾化痰方高含药血清组比较, $P<0.01$ 。

3.5 各组细胞中 USP4、HDAC2 蛋白水平比较

表 6 示, 与对照血清组比较, 除 HDAC2 抑制剂组 USP4 蛋白水平外, 其余各组细胞中 USP4、HDAC2 蛋白水平均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与健脾益肾化痰方低含药血清组比较, USP4 抑制剂组 USP4 蛋白水平降低, 健脾益肾化痰方高含药血清组和 HDAC2 抑制剂组 HDAC2 蛋白水平降低 ($P<0.05$); 与健脾益肾化痰方中含药血清组比较, USP4 抑制剂组 USP4 蛋白水平降低 ($P<0.05$); HDAC2 抑制剂组 USP4 蛋白水平高于对照血清组及健脾益肾化痰方低、中、高含药血清组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组细胞中 USP4、HDAC2 蛋白电泳图见图 2。

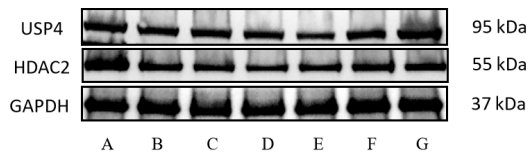
表 6 各组人肺鳞癌细胞中 USP4、HDAC2 蛋白
相对表达量比较

Table 6 Comparison of relative expression of USP4 and
HDAC2 proteins in human lung squamous carcinoma cells of
various groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	复孔数	USP4	HDAC2
对照血清组	3	1.00	1.00
健脾益肾化痰方低含药血清组	3	0.83±0.05 ^{a)}	0.81±0.07 ^{a)}
健脾益肾化痰方中含药血清组	3	0.82±0.04 ^{a)}	0.72±0.02 ^{a)}
健脾益肾化痰方高含药血清组	3	0.75±0.06 ^{b)}	0.65±0.09 ^{b)c)}
LncRNA 沉默组	3	0.85±0.07 ^{a)}	0.80±0.09 ^{a)}
USP4 抑制剂组	3	0.65±0.11 ^{b)c)e)}	0.74±0.11 ^{b)}
HDAC2 抑制剂组	3	1.17±0.08 ^{a)d)f)g)}	0.62±0.17 ^{b)c)}

注: USP4, 泛素特异性蛋白酶 4; HDAC2, 组蛋白去乙酰化酶 2。

a) 与对照血清组比较, $P<0.05$; b) 与对照血清组比较, $P<0.01$; c) 与健脾益肾化痰方低含药血清组比较, $P<0.05$; d) 与健脾益肾化痰方低含药血清组比较, $P<0.01$; e) 与健脾益肾化痰方中含药血清组比较, $P<0.05$; f) 与健脾益肾化痰方中含药血清组比较, $P<0.01$; g) 与健脾益肾化痰方高含药血清组比较, $P<0.01$ 。



注: USP4, 泛素特异性蛋白酶 4; HDAC2, 组蛋白去乙酰化酶 2; GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; A, 对照血清组; B, 健脾益肾化痰方低含药血清组; C, 健脾益肾化痰方中含药血清组; D, 健脾益肾化痰方高含药血清组; E, USP4 抑制剂组; F, LncRNA 沉默组; G, HDAC2 抑制剂组。

图 2 各组肺鳞癌细胞中 USP4、HDAC2 蛋白电泳图
Figure 2 Electrophoresis of USP4 and HDAC2 proteins
in various groups of lung squamous carcinoma cells

4 讨论

根据肺癌的临床表现, 可将其归属中医学“肺积”“息贲”“咳嗽”“咯血”“胸痛”等范畴。《难经·五十六难》记载:“肺之积, 名曰息贲, 在右胁下, 覆大如杯, 久不已, 令人洒淅寒热, 喘咳, 发肺壅。”中医学认为, 肺癌与脾肾两虚、痰浊积聚有密切关系。《景岳全书》曰:“凡脾肾不足, 及虚弱失调之人, 多有积聚之病。盖脾虚则中焦不运, 肾虚则下焦不化, 正气不行, 则邪滞得以居之。”《杂病源流犀烛》记载:“邪积胸中, 阻塞气道, 气不得通, 为痰, 为食, 为血, 皆邪正相搏, 邪既胜, 正不得制之, 遂结成形而有块。”在肺癌的发生发展过程中, 脾肾两虚与痰凝的病机相互影响, 形成恶性循环, 导致病情逐渐加重。痰湿、瘀血、热毒等积聚在肺部, 日久不散, 从而形成癌肿^[10]。健脾益肾化痰方中以人参、白术、鸡内金、黄芪为君药。人参大补元气, 补脾益肺; 白术健脾益气, 燥湿利水; 鸡内金健胃消食; 黄芪补气升阳, 固表止汗。四味药合用, 共奏益气、健脾胃之功, 以充养后天之本。臣药选用当归、熟地黄、山萸肉。当归补血活血; 熟地黄补血滋阴, 益精填髓; 山萸肉补益肝肾, 收涩固脱。三药相伍, 填精补血。佐以鳖甲、法半夏、浙贝母。鳖甲滋阴潜阳, 软坚散结; 法半夏燥湿化痰, 降逆止呕; 浙贝母清热化痰, 散结消痞。三味药共同发挥化痰散结的作用, 以祛除体内的痰湿之邪。诸药合用, 扶正固本, 散结祛邪, 攻补兼施, 使正气得复, 邪气得除。

一项针对 7000 多例肿瘤患者基因组拷贝数的分析研究发现, LncRNA ALAL-1 在肿瘤细胞中的表达明显高于正常细胞, 且细胞质内 LncRNA ALAL-1 能够诱导 USP4 向核易位, 提示 LncRNA ALAL-1 可能是一种促癌 LncRNA^[5]。USP4 通过对肿瘤抑制蛋白进行去泛素化修饰, 增加其稳定性, 进而促进了肿瘤细胞迁移和侵袭, 抑制肿瘤细胞凋亡, 使得肿瘤细胞得以逃避正常的生长调控机制而不断增殖^[11]。USP4 可通过其去泛素化酶的活性, 去除 HDAC2 上的泛素化修饰, 从而增强 HDAC2 的稳定性^[6]。HDAC2 高表达于多种常见肿瘤, 如肺癌、胃癌、卵巢癌等^[12], 能够通过影响染色质的结构, 对细胞中相关的基因启动子区域的组蛋白进行去乙酰化修饰^[13]。当 HDAC2 表达异常升高时, 该区域过度去乙酰化, 使得相关促凋亡基因无法正常转录, 导致细胞凋亡程序受阻^[14-15]。有研究^[16]显示, HDAC2 表达下调可增加癌细胞半胱天冬酶 3

(Caspase-3) 和半胱天冬酶 9 (Caspase-9) 促凋亡蛋白的高表达, 提示 HDAC2 的阻断可抑制肿瘤细胞的增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡。

本研究结果显示, 健脾益肾化痰方中、高浓度含药血清组人肺鳞癌细胞总凋亡率显著高于对照血清组及健脾益肾化痰方低浓度含药血清组, 表明该方剂在达到一定浓度时具有显著的促凋亡作用。然而, 中、高浓度含药血清之间的凋亡率差异无统计学意义, 提示在此浓度范围内促凋亡效应可能达到平台期。细胞划痕实验聚焦于肿瘤细胞的迁移能力, 结果显示健脾益肾化痰方低、中、高浓度含药血清组的细胞迁移率均显著低于对照血清组, 且迁移率随含药血清浓度的增加呈浓度依赖性降低, 表明该方剂能有效抑制肺鳞癌细胞的迁移运动, 且抑制效果随浓度增强而提升。CCK-8 实验结果进一步显示, 健脾益肾化痰方低、中、高含药血清组在 24 h 和 48 h 的细胞存活率均显著低于同时时间点的对照血清组, 存活率随含药血清浓度增加而降低, 呈现浓度依赖性趋势。同时, LncRNA 沉默组、USP4 抑制剂组和 HDAC2 抑制剂组细胞存活率也均显著低于同时时间点的对照血清组, 其效应与健脾益肾化痰方含药血清组作用相似, 提示抑制 LncRNA ALAL-1/USP4/HDAC2 通路的关键环节可以影响癌细胞存活, 健脾益肾化痰方可能通过作用于这一通路发挥抑制增殖的作用。

为了深入探讨该方剂的作用机制与 LncRNA ALAL-1/USP4/HDAC2 通路之间的关联, 本研究检测肺鳞癌细胞中 ALAL-1、USP4、HDAC2 相关基因和蛋白的表达。结果显示, 健脾益肾化痰方低、中浓度含药血清主要降低 USP4 和 HDAC2 mRNA 表达, 健脾益肾化痰方低浓度含药血清对 LncRNA ALAL-1 mRNA 表达未显示显著作用, 高浓度含药血清则能同时显著抑制 LncRNA ALAL-1、USP4 和 HDAC2 mRNA 表达, 与各抑制剂组作用后表现相同趋势。蛋白检测结果也表明, 随着健脾益肾化痰方含药血清浓度增加, USP4、HDAC2 蛋白水平降低, 均显著低于对照血清组, 与各抑制剂作用后的趋势一致。这种浓度依赖的抑制作用, 在临床用药剂量的选择上具有重要参考意义, 提示在安全范围内适当提高药物浓度, 可能更有效地抑制肿瘤细胞增殖。

综上所述, 健脾益肾化痰方能够抑制人肺鳞癌细胞增殖, 促进肺鳞癌细胞发生凋亡, 其作用机制可能与其调控 LncRNA ALAL-1/USP4 通路抑制 HDAC2 的增长, 从而介导肺鳞癌细胞凋亡相关。然而, 本研究主要从体外细胞实验水平进行验证,

实验结果的临床转化还需要进一步验证; 此外, LncRNA ALAL-1/USP4/HDAC2 信号通路与其他信号通路之间的相互作用尚未明确, 可能存在其他潜在的作用靶点和机制有待进一步探索。

参考文献

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3):229-263.
- [2] 陈新立, 王志光. 健脾益肾化痰方联合 DP 化疗方案治疗中晚期肺鳞癌的效果[J]. 中国医药导报, 2021, 18(29):102-105.
- [3] HAN SC, WANG GZ, YANG YN, et al. Nuclear AhR and membranous PD-L1 in predicting response of non-small cell lung cancer to PD-1 blockade [J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1):191.
- [4] WU M, FU P, QU L, et al. Long Noncoding RNAs, new critical regulators in cancer immunity [J]. Front Oncol, 2020, 10:550987. doi: 10.3389/fonc.2020.550987.
- [5] ATHIE A, MARCHESE FP, GONZÁLEZ J, et al. Analysis of copy number alterations reveals the lncRNA ALAL-1 as a regulator of lung cancer immune evasion [J]. J Cell Biol, 2020, 219(9):e201908078.
- [6] LI Z, HAO Q, LUO J, et al. USP4 inhibits p53 and NF-κB through deubiquitinating and stabilizing HDAC2 [J]. Oncogene, 2016, 35(22):2902-2912.
- [7] MARIAROSARIA C, CARMELA D, ROSARIA B, et al. HDAC2 deregulation in tumorigenesis is causally connected to repression of immune modulation and defense escape [J]. Oncotarget, 2015, 6(2):886-901.
- [8] SOMANATH P, HERNDON KLEIN R, KNOEPFLER PS. CRISPR-mediated HDAC2 disruption identifies two distinct classes of target genes in human cells [J]. PLoS One, 2017, 12(10):e0185627.
- [9] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2011:1262-1264.
- [10] 方以峻, 熊常州, 覃慧敏, 等. 健脾益肾化痰法在肺癌治疗中的应用与意义研究进展[J]. 中国医药导报, 2025, 22(2):40-44.
- [11] LI T, YAN B, MA Y, et al. Ubiquitin-specific protease 4 promotes hepatocellular carcinoma progression via cyclophilin A stabilization and deubiquitination [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2):148.
- [12] LI Y, SETO E. HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016, 6(10):a026831.
- [13] HABERLAND M, MONTGOMERY RL, OLSON EN.

The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy[J].

Nat Rev Genet, 2009, 10(1):32-42.

- [14] LI S, WANG F, QU Y, et al. HDAC2 regulates cell proliferation, cell cycle progression and cell apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma EC9706 cells[J]. Oncol Lett, 2017, 13(1):403-409.

- [15] GUAN X, LIU R, WANG B, et al. Inhibition of HDAC2 sensitises antitumour therapy by promoting NLRP3/GSDMD-mediated pyroptosis in colorectal cancer [J]. Clin Transl Med, 2024, 14(6):e1692.

- [16] 袁林林, 姜卫华, 桑建中, 等. 组蛋白去乙酰化酶 2 表达下调对喉鳞癌 Hep-2 细胞凋亡和增殖及迁移的影响[J]. 中华病理学杂志, 2012, 41(6):396-399.

Effects of *Jianpi Yishen Huatan Formula* (健脾益肾化痰方) -Medicated Serum on Apoptosis, Migration and the LncRNA ALAL-1/USP4/HDAC2 Pathway in Human Lung Squamous Carcinoma Cells

FANG Yijun¹, WANG Xuemei¹, XIONG Changzhou¹, LI Liubang¹, QIN Huimin¹, WANG Zhiguang²

1. Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, 530200; 2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the potential mechanism of the *Jianpi Yishen Huatan Formula* (健脾益肾化痰方, JPYSHF) in treating squamous cell lung cancer through the LncRNA ALAL-1/USP4/HDAC2 signaling pathway.

Methods Forty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into a control group and high-, medium-, and low-dose JPYSHF group with 10 rats in each group. Rats in the JPYSHF groups were administered JPYSHF concentrated liquid at doses of 45, 30, and 15 g/(kg·d) via intragastric gavage, respectively, while the control group received 10 ml/(kg·d) of normal saline, once daily for 10 consecutive days before preparation of drug containing serum. Human lung squamous carcinoma SK-MES-1 cells were divided into a control group and low-, medium-, and high-dose JPYSHF-medicated serum groups. The control group was cultured with 10% saline-containing serum, while the JPYSHF groups were cultured with 10% low-, medium-, or high-dose medicated serum. After 48 hours of incubation, flow cytometry was used to detect apoptosis rates, and a cell scratch assay was performed to evaluate migration areas at 0 h and 24 h to calculate migration rate. Additional SK-MES-1 cells were divided into control serum, JPYSHF-medicated serum (low-, medium-, high-) dose, LncRNA-silenced group (transfected with ALAL-1 siRNA), USP4-inhibited group (treated with 35 μmol/L PR-619, a deubiquitinase inhibitor), and HDAC2-inhibited group (treated with 60 μmol/L Vorinostat). After 24 and 48 hours of culture, cell viability was assessed using the CCK-8 assay; LncRNA ALAL-1, USP4, and HDAC2 mRNA levels were quantified by qPCR after 24 hours; USP4 and HDAC2 protein levels were measured by Western Blot after 48 hours. **Results** Compared with the control serum group, the total apoptosis rate of cells in middle- and high-JPYSHF-medicated serum group significantly increased, and the cell migration rate of cells in the low-, middle- and high-JPYSHF-medicated serum group significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The cell migration rate of the low-, medium- and high-JPYSHF-medicated serum groups decreased with the increase of concentration in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the control serum group at the same time, the cell viability at 24 h and 48 h significantly decreased in all groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the low-JPYSHF-medicated serum group at the same time, the cell viability at 24 h and 48 h also decreased in the high-JPYSHF-medicated serum group and the LncRNA silencing group ($P < 0.05$). Compared with the control serum group, the expression of USP4 and HDAC2 mRNA reduced in the low- and medium-dose JPYSHF-medicated serum groups and the USP4 inhibitor group, and the expression of LncRNA ALAL-1, USP4 and HDAC2 mRNA reduced in the high-dose JPYSHF-medicated serum group and LncRNA-silencing group, and HDAC2 mRNA expression reduced in the HDAC2 inhibitor group. USP4 and HDAC2 protein levels were reduced in cells of all groups except for USP4 protein level in HDAC2 inhibitor group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion**

JPYSHF-medicated serum inhibits proliferation and promotes apoptosis of human lung squamous carcinoma cells, and its mechanism of action may be related to its inhibition of the LncRNA ALAL-1/USP4/HDAC2 pathway, with best effect at a high concentration.

Keywords squamous cell lung cancer; *Jianpi Yishen Huatan Formula* (健脾益肾化痰方); apoptosis; cell migration; long non-coding RNA; ubiquitin-specific protease 4; histone deacetylase 2

(收稿日期: 2025-03-03; 修回日期: 2025-04-14)

[编辑: 邓媛]